

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

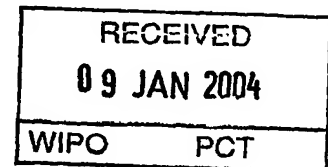
14.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年11月15日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-332142
[ST. 10/C]: [JP2002-332142]



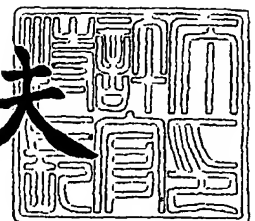
出 願 人
Applicant(s): 学校法人慶應義塾

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月18日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 C0020699

【提出日】 平成14年11月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区日吉 3 丁目 1 4 番 1 号 慶応義塾
大学理工学部内

【氏名】 井本 正哉

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区日吉 3 丁目 1 4 番 1 号 慶応義塾
大学理工学部内

【氏名】 湊 雄介

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区日吉 3 丁目 1 4 番 1 号 慶応義塾
大学理工学部内

【氏名】 田代 悦

【特許出願人】

【識別番号】 899000079

【氏名又は名称】 学校法人 慶應義塾

【代理人】

【識別番号】 100071283

【弁理士】

【氏名又は名称】 一色 健輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100084906

【弁理士】

【氏名又は名称】 原島 典孝

【選任した代理人】

【識別番号】 100098523

【弁理士】

【氏名又は名称】 黒川 恵

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011785

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β 及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示される塩基配列、又はその一部を有するポリヌクレオチド。

【請求項2】 配列番号1に示される塩基配列において、1個若しくは数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加され、PDGF受容体 α 遺伝子のセンス鎖の塩基配列に含まれる塩基配列、又はその一部を有するポリヌクレオチド。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列、又はその一部を有するポリヌクレオチド。

【請求項4】 PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAを標的とすることを特徴とするPDGF受容体 α の発現抑制方法。

【請求項5】 アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又はRNAiを用いることを特徴とする請求項4記載のPDGF受容体 α の発現抑制方法。

【請求項6】 アンチセンスRNA、リボザイム、マキシザイム、又はRNAiのいずれかをコードするDNAを用いることを特徴とする請求項4記載のPDGF受容体 α の発現抑制方法。

【請求項7】 PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAを標的とすることを特徴とするPDGF受容体 α の発現抑制物質。

【請求項8】 アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又はRNAiであることを特徴とする請求項7記載のPDGF受容体 α の発現抑制物質。

【請求項9】 アンチセンスRNA、リボザイム、マキシザイム、又はRNAiのいずれかをコードするDNAであることを特徴とする請求項7記載のPDGF受容体 α の発現抑制物質。

【請求項10】 請求項7～9のいずれかに記載の発現抑制物質を有効成分とすることを特徴とするPDGF受容体 α の発現抑制剤。

【請求項11】 請求項10に記載の発現抑制剤を含有することを特徴とす

る癌の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β 又はその一部を有するポリヌクレオチド、並びにPDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAを標的とするPDGF受容体 α の発現抑制方法、発現抑制物質、及び発現抑制剤、並びに癌の治療剤に関する。

【0002】

【用語の定義】

PDGF受容体 α 遺伝子とは、GenBankアクセッション番号AC026580及びAC025013に示される塩基配列により構成されているもの及びそのホモログをいう。ヒトPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β とは、配列番号1に示される塩基配列を有するポリヌクレオチドを含んで構成されているエキソンをいい、PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β とは、配列番号1に示される塩基配列を有するポリヌクレオチドを含んで構成されているエキソン及びヒト以外の生物種においてそれに対応するエキソンをいう。

【0003】

PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β は、mRNA上の非翻訳領域であるため、ヒト以外の生物種において、必ずしも塩基配列のレベルで高い相同性を有する必要はなく、特定の細胞種で転写されるという機能的な面は保存されている必要があり、例えば、E2F-1によって転写が制御されるというもう一方のエキソン1に見られない特徴を必要とする。

【0004】

mRNAとは、転写されてできたhnRNAからイントロン部分が除去され、エキソン部分が結合して形成されたRNAをいう。

【0005】

タンパク質の発現とは、DNA上の遺伝情報がmRNAから正確に翻訳されてタンパク質を産生することを意味する。従って、PDGF受容体 α の発現抑制物

質とは、PDGF受容体 α 遺伝子からのPDGF受容体 α タンパク質の産生を抑制する物質をいう。

【0006】

PDGF受容体 α 遺伝子のアンチセンスヌクレオチドとは、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAの塩基配列に対し相補的なヌクレオチドをいい、アンチセンスRNA又はアンチセンスDNAであってもよく、ヌクレオチドが修飾されていてもよい。上記アンチセンスRNA又はDNAは、対象となる遺伝子から転写されるmRNAの配列に対し相補的なRNA又はDNAをいい、細胞内での遺伝情報の発現を遮断し、目的とするタンパク質への産生を特異的に抑制するために用いられる。

【0007】

リボザイムとは、酵素活性をもつRNAの総称であり、生物由来のRNAを特異的に切断する酵素をいう。細胞内に取り込まれると標的RNA配列を切断する機能を有する。その結果として標的RNAからのタンパク質の発現が抑制される。標的RNA配列に対する特異性が高いため、タンパク質の発現抑制物質としては好ましい。リボザイムには、ハンマーヘッド型リボザイムや、ヘアピン型リボザイム (hairpin ribozyme) などが含まれる。

【0008】

マキシザイムとは、一般的にWO99/46388号公報の明細書に記載のように、二量体の構造を形成するRNA分子であって、例えば、その2本のRNA分子が、正常細胞におけるmRNAを認識しないで、癌細胞に特異的なmRNAを認識するようにマキシザイムを構成することにより、癌細胞に特異的なmRNAのみを切断することができる。

【0009】

RNAiとは、RNA干渉 (RNA interference) と称される現象を誘導する二重鎖RNA (dsRNA) を利用した方法をいう。RNA干渉と称される現象とは、上記二重鎖RNAを細胞内に導入すると標的となる遺伝子の発現が抑制される現象であり、現在、ホストの内在する機構により21～23塩基対に短く切断され、短く切断されたRNA分子はホストの遺伝子から転写されるmRNAを認

識して配列特異的に分解し、その結果としてホストの遺伝子がコードするタンパク質の発現を特異的に抑制するためとされている。

【0010】

【従来の技術】

血小板由来増殖因子 (PDGF) は、細胞の増殖や発生・分化、創傷治癒、さらには癌悪性化や動脈硬化などにおいて重要な役割を果たしている。したがって、PDGFシグナルを制御することはこれら疾患の治療薬となることが期待されている。実際には、治療薬としてPDGFの発現抑制剤（例えば、特許文献1参照）や、PDGFとPDGF受容体 α との結合阻害剤（例えば、特許文献2参照）や、PDGF受容体 α のチロシンキナーゼ阻害剤（例えば、特許文献3参照）が提案されている。

【0011】

【特許文献1】

特開平10-59850号公報

【0012】

【特許文献2】

特表平8-500010号公報

【0013】

【特許文献3】

特表2002-514228号公報

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、これらの抑制剤や阻害剤は癌特異的なPDGFシグナルだけではなく、正常なPDGFシグナルにも影響を与える恐れがある。そこで、本発明は癌細胞に特異的なPDGFシグナルだけを選択的に抑制できる発現抑制方法に用いるためのポリヌクレオチド、発現抑制物質、発現抑制剤、及び癌の治療剤を提供することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明にかかるポリヌクレオチドは、配列番号 1 に示される塩基配列、又はその一部を有することを特徴とする。

また、本発明にかかるポリヌクレオチドは、配列番号 1 に示される塩基配列において、1 個若しくは数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加され、PDGF 受容体 α 遺伝子のセンス鎖の塩基配列に含まれる塩基配列、又はその一部を有することを特徴とする。

さらに、本発明にかかるポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチドと相補的な塩基配列、又はその一部を有するポリヌクレオチドであってもよい。

【0016】

これらのポリヌクレオチドは、2 本鎖 DNA、1 本鎖 DNA、2 本鎖 RNA、1 本鎖 RNA のいずれであってもよい。また、1 個若しくは数個の塩基の欠失、置換、若しくは付加等の遺伝的多型 (genetic polymorphism) をもち、PDGF 受容体 α 遺伝子のセンス鎖の塩基配列に含まれる塩基配列を有するポリペプチドも本発明の範囲内であるが、同等の機能をもつものが好ましく、E2F-1 により転写調節されるものが特に好ましい。

【0017】

本発明の PDGF 受容体 α の発現抑制方法は、PDGF 受容体 α 遺伝子の mRNA のうちエクソン 1 β を含む mRNA を標的とすることを特徴とする。「mRNA を標的とする」とは、直接的又は間接的に、特異的に該 mRNA から、そのコードされるタンパク質を生成しないようにすることをいう。

本発明の PDGF 受容体 α の発現抑制方法は、アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又は RNA i を用いた方法であってもよい。

本発明の PDGF 受容体 α の発現抑制方法は、アンチセンス RNA、リボザイム、マキシザイム、又は RNA i のいずれかをコードする DNA を用いた方法であってもよい。

【0018】

本発明にかかる PDGF 受容体 α の発現抑制物質は、PDGF 受容体 α 遺伝子の mRNA のうちエクソン 1 β を含む mRNA を標的とすることを特徴とする。それは、例えば、発現抑制物質が該 mRNA に結合したり、該 mRNA を分解し

たりすることによるが、発現抑制物質が間接的に、他の物質を該 mRNA に結合させたり、他の物質により該 mRNA を分解したりしてもよい。

本発明にかかる PDGF 受容体 α の発現抑制物質としては、アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又は RNA i など具体的に挙げることができる。

本発明にかかる PDGF 受容体 α の発現抑制物質としては、アンチセンス RNA、リボザイム、マキシザイム、又は RNA i のいずれかをコードする DNA などを具体的に挙げることができる。

本発明にかかる PDGF 受容体 α の発現抑制剤は、前記発現抑制物質を有効成分とすることを特徴とする。

本発明にかかる癌の治療薬は、前記発現抑制剤を含有することを特徴とする。

【0019】

【発明の実施の形態】

癌細胞においては、ほとんどの場合、RB タンパク質などの癌抑制タンパク質が関与するシグナル伝達経路に異常が起きていることが知られている。例えば、RB タンパク質の上流で働くサイクリン D 1 の過剰発現は、増殖因子に対する感受性を亢進させることにより、癌細胞の悪性化に寄与すると考えられている。in vitro での細胞培養系では、サイクリン D 1 を過剰発現させた細胞株に FGF (fibroblast growth factor; 繊維芽細胞増殖因子) を加えることにより、その細胞は悪性化する。本願発明者は、PDGF (platelet-derived growth factor; 血小板由来増殖因子) も同様の働きをする、即ちサイクリン D 1 を過剰発現させた細胞株を悪性化させることを見いだした。

【0020】

サイクリン D 1-RB 経路の下流には、転写因子 E2F-1 が存在し、FGF 受容体の発現を亢進することにより、FGF に対する感受性を亢進させる。実施例で詳細に後述するように、E2F-1 は PDGF 受容体 α の発現も亢進するが、本願発明者は、従来知られているプロモーターに作用するのではなく、従来のイントロン 1 中に新たな E2F-1 によって制御される新規プロモーター領域を見だし、その新規プロモーターによって転写される際に用いられる新規エキソ

ン 1 β を同定した。

【0021】

このように、E2F-1 と PDGF が関与する癌の悪性化において、これらの因子のターゲットの一つは、PDGF 受容体 α のエキソン 1 β を有する mRNA であることが明らかになった。従って、このエキソン 1 β を有する転写産物からの PDGF 受容体 α の産生を特異的に阻害することにより、癌細胞の悪性化につながるシグナル経路を断つことができ、癌細胞の増殖を抑制できる。なお、サイクリン D1-E2F-1 経路に限らず、癌細胞の増殖が、エキソン 1 β を有する mRNA を過剰に転写させることにより、PDGF 受容体 α と共同して癌の悪性化をひき起こす因子によるのであれば、その癌細胞の増殖阻害に本発明を適用できる。

【0022】

以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd. などの標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

【0023】

なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並

びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

【0024】

配列番号1に示されるヒトPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β の塩基配列、又はその一部を有するポリヌクレオチドは、配列番号1に示される塩基配列情報に基づき、cDNAライブラリーやゲノムライブラリーなどのヒト遺伝子ライブラリーから調製することができる。また、マウス、ラット、ニワトリ、ブタ、イヌ、サルなどヒト以外の生物種由来のPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β もE2F-1によって転写制御されることで特定されるが、例えば、ヒトPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β とのハイブリダイゼーションや、従来のイントロン1中の配列のうち新たなエキソンを調べることなどによっても同定でき、これらも本発明のポリヌクレオチドに含まれる。

【0025】

図1に示すように、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAは、特定の癌細胞にしか検出されない。従って、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAを標的とした発現抑制方法、並びに本発明のポリヌクレオチド、発現抑制物質、及び発現抑制剤などは、特定の癌細胞（例えば、ヒト大腸癌細胞SW480やヒト食道癌細胞TTnなどを具体的に挙げることができる。）を攻撃するための癌の治療方法や癌の治療剤として有用である。

【0026】

本発明における発現抑制方法としては、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAを標的とするものであって、例えばPDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAに結合し、翻訳を抑制してPDGF受容体 α の発現を抑制する方法や、上記mRNAを分解又は切断してPDGF受容体 α の発現を抑制する方法であってもよい。以下にアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又はRNAiなどの発現抑制物質を用いた発現抑制方法について例を挙げて説明する。

【0027】

(1) アンチセンスヌクレオチドの調製

本発明の発現抑制方法に用いるアンチセンスヌクレオチドとしては、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β に対応する部分の塩基配列又はその一部に相補的な塩基配列を含むアンチセンスRNA又はアンチセンスDNAを具体的に例示することができる。また、15～30の塩基配列からなるアンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。

【0028】

本発明のアンチセンスヌクレオチドは、構造上、その配列の位置、長さ、修飾化、ミスマッチの存在等には制限されるものではない。上記修飾したアンチセンスヌクレオチドとしては、体内又は細胞内においてアンチセンスヌクレオチドを安定化させるために、ホスホジエステル結合のリン酸基の酸素原子の一つを硫黄原子又はメチル基に修飾したアンチセンスヌクレオチドや、モルフォリノ (morpholino) で修飾したアンチセンスヌクレオチドを具体的に例示することができる。

【0029】

本発明のアンチセンスDNAは、S1ヌクレアーゼなどのDNA依存性DNAポリメラーゼを用いて、プライマー・エクステンション法によりin vitroで合成できる。また、アンチセンス鎖の一部をプライマーとしてPCRを行うことにより、アンチセンス鎖だけを合成することができる。また、DNA合成機を用いることなどによって、人工的に合成してもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成もアンチセンスDNAに準じるが、人工的に合成するのが最も好ましい。

【0030】

一方、本発明のアンチセンスRNAは、例えば、RNA合成機や固相合成法などにより容易に合成することができる。その後、HPLCを用いてNH₃OH/EtOHで溶出することにより、目的のRNAを単離することができる。

【0031】

本発明のアンチセンスRNAは、このように人工的に合成してもよいが、T7 RNAポリメラーゼが特異的に認識するプロモーター配列 (5'-TAATACGACTCACTATA-3' : 配列番号2) の下流に、アンチセンスRNAに対応するDNA配列をもつ2重鎖DNAを挿入したベクターを作製し、T7 RNAポリメラーゼを用い

てin vitro転写系によって合成してもよい。

【0032】

また、アンチセンスRNAに対応するDNAを組み込んだウイルスベクター又はプラスミドなどの発現ベクターを用いてアンチセンスRNAを細胞内で発現させてもよい。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターなどであってもよい。

【0033】

(2) リボザイムを挿入したプラスミドの調製

リボザイムは、図2に示すように、標的のmRNAの塩基配列に相補的な塩基配列（リボザイムの5'末端部分と3'末端部分の塩基配列を示す。）と、触媒活性部位（○印で示した塩基）を有する24の塩基配列とを有する。リボザイムの5'末端部分と3'末端部分の塩基配列が標的のmRNAの塩基配列と特異的に結合すると、mRNA上にあるNUX配列（Nは任意の塩基であって、Xはa、u、cのいずれかの塩基を意味する。）で切断して標的のmRNAを分解させることができる。すなわち、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β に対応する部分の塩基配列を基にリボザイムを合成して細胞内に投与すれば、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAを特異的に切断することができると考えられる。

【0034】

従って、本発明の発現抑制物質であるリボザイムは、配列番号1に示されるヒトPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β の塩基配列から、NUX配列に対応する配列を選択してその配列を含む15～20の塩基配列に相補的な塩基配列と、触媒活性部位（○印で示した塩基）を有する24の塩基配列とを含むようにすればよい。NUX配列に対応する配列としては、例えば、配列番号1に示される34～36番目のGTCや、75～77番目のGTCや、78～80番目のGTCや、81～83番目のGTCや、172～174番目のGTCや、267～269番目のGTCを挙げることができる。なお、上記リボザイムは、ハンマーヘッド型リボザイムや、ヘアピン型リボザイム（hairpin ribozyme）であってもよい。

。

【0035】

実際の合成方法は、人工合成、in vitro合成、発現ベクターによる細胞内合成などがあり、(1)のアンチセンスRNAの場合と同様なので、ここでは説明は省略する。

【0036】

(3) マキシザイムの設計及び調製

マキシザイムは、図3に示すように、二量体の構造を形成するRNA分子からなり、両方のRNA分子には標的RNAを特異的に認識するセンサー部位（図中にX・・・Xの部分を示し、Xは任意の塩基を意味する。なお、上段のXと下段のXはそれぞれ相補性の塩基を意味する。）と、触媒活性部位（図中において二重鎖を形成しない部分を示す。）と、標的RNAを含むmRNA上にあるNUX配列（Nは任意の塩基であって、XはA、U、Cのいずれかの塩基を意味する。図中においてはGUC配列の部分を示す。）及びその上流（図中においてはGUC配列の部分の上流を示す。）又は下流（図中においてはGUC配列の部分の下流を示す。）を認識する部位を有する。マキシザイムのセンサー部位が標的RNAを特異的に認識して結合し、また、マキシザイムのもう一方の部分が標的RNAを含むmRNA上にあるNUX配列の上流及び下流を特異的に認識して結合すると、標的RNAを含むmRNA上にあるNUX配列を切断して標的のmRNAを特異的に分解することができる。すなわち、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β に対応する部分の塩基配列を基にマキシザイムを合成して細胞内に投与すれば、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAを特異的に切断できると考えられる。

【0037】

例えば、PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β を標的RNAとして、その標的RNAに相補的な塩基配列をセンサー部位とする。また、標的RNAの下流に存在するNUX配列をPDGF受容体 α のmRNAから選択して、NUX配列の上流と下流の配列に相補的な塩基配列を決定する。NUX配列は、PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β のmRNA上のものであってもよい。これらの情報から、マキシザイムの各RNA分子をRNA合成機に合成することにより、マキシ

ザイムを作製することができる。なお、図中のXの領域は1又は数個の増減があってもよい。

【0038】

実際の合成方法は、人工合成、in vitro合成、発現ベクターによる細胞内合成などがあり、(1)のアンチセンスRNAの場合と同様なので、ここでは説明は省略する。ただし、マキシザイムは2分子のRNAを用いるため、発現ベクターを用いて細胞内で発現させる場合、2分子のRNAを一つのベクターに組み込んでも、二つのベクターに別々に組み込んでも構わない。

【0039】

(4) RNA i の調製

目的の遺伝子に対応する二重鎖RNAが生体内に導入されると、対応する mRNA が分解するという報告がある (Bass, B. L. (2000) Cell 101, 235-238、Fire, A. (1999) Trends Genet. 15, 358-363、Sharp, P. A. (2001) Genes Dev. 15, 485-490)。従って、PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β 、又はその一部を有するmRNAに対応する二重鎖RNA (RNA i) を細胞内又は生体内に導入すれば、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAが分解されと考えられる。

【0040】

本発明の発現抑制物質であるRNA i は以下のように調製することができる。PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β のセンス鎖、又はその一部の塩基配列に対応するRNAと、そのRNAに相補的なRNAとを、RNA合成機を用いて人工的に合成することができる。また、HiScribe RNAi Transcription Kit (NEB社製) を用いて、in vitro及びin vivoで合成してもよい。

【0041】

その他、PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β 又はその一部を正と負の両方向にクローニングしたウイルスベクター又はプラスミドなどの発現ベクターをそれぞれ細胞内に導入し、DNAの両鎖を細胞内で発現させることによって、細胞内でRNA i ができるようにし、標的のmRNAを分解させるようにしてもよい。また、PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β 又はその一部に対応する二重鎖

の各鎖のDNA配列を融合した配列を持つDNA、すなわち、センス鎖のDNAの3'末端とアンチセンス鎖のDNAの5'末端を融合させた配列を持つDNA、又は相補的なDNAの3'末端とセンス鎖のDNAの5'末端を融合させた配列を持つDNAを発現ベクターに組み込んだものを用いてもよい。上記ウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターなどであってもよい。なお、これらのRNA iは30ベース以内のものが望ましく、21ベースが最も望ましい。

【0042】

(5) 発現抑制物質の導入

in vitroの細胞培養系において発現抑制物質を細胞内へ導入する際、調製したアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、RNA iなどの発現抑制物質を、対象の癌細胞に対し、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、アデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターなどを用いたウイルス感染法、又はカルシウムを用いたトランスフェクション法等を用いる。

【0043】

一方、in vivoで行う発現抑制剤の個体への導入方法としては、前記調製したアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、RNA iなどの発現抑制物質を有効成分とする発現抑制剤を、ヒトまたはヒト以外の脊椎動物において、導入対象の癌細胞の近傍に直接投与するか、発現抑制剤によっては非経口、経口、皮内、皮下、静脈内、筋肉内、又は腹腔内に投与する方法であってもよい。この場合発現抑制剤は、使用する部位又は目的に応じて、薬理学的に許容された適切な賦形剤又は基剤をさらに含有してもよい。

【0044】

個体に投与する発現抑制剤としては、発現抑制物質が細胞内に取り込まれやすいように調製されているものが好ましい。例えば、前記アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、RNA iをコードするDNAをウイルスベクターに組み込んだ発現ベクターをin vitroで適当な細胞株に感染させ、ウイルスを産生し、そのウイルスを注射 (inject) して感染させる方法であってもよい。ウ

イルスベクターとしては、細胞内で発現するアデノウイルスベクターや、レトロウイルスベクターを用いてもよい。

【0045】

また、前記発現ベクターをリポソームの中に入れて癌細胞と融合されることによって、プラスミドを細胞内に導入させてもよい。また、TransIT In Vivo Gene Delivery System (TaKaRaの商品名)を用いて、in vivo トランスフェクションを行ってもよい。この場合、発現抑制剤は、患部に直接注射しても、静脈注射してもよい。

【0046】

また、前記調製したアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、RNAiなどのRNAを、in vitro selection法により細胞内に導入されやすいHIVのTATなどのペプチドと結合させたRNAアプタマーを発現抑制剤として注射してもよい。

【0047】

対象の癌細胞としては、ヒト大腸癌細胞SW4.80やヒト食道癌細胞TTnを具体的に例示することができるが、PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β から転写されるmRNAが確認できる癌細胞であれば、どのようなものでもよい。

【0048】

(6) 発現抑制物質による発現抑制の評価

前記(5)記載の方法により、in vitroで培養された特定の癌細胞に発現抑制物質を導入したものと、導入していないものについて、RT-PCR法によりPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β から転写されたmRNAの量を比較評価することにより、発現抑制物質による発現抑制の評価を行うことができる。その他、ノザン・プロッティング法などによりPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β から転写されたmRNAの量を評価する方法であってもよい。この結果を用いて、PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β から転写されたmRNAの翻訳をより有効に抑制することができるアンチセンスヌクレオチドが見出せる。

上記はin vitroによる実験であるが、in vivoにおける実験においても評価することが可能である。

【0049】

in vivoでの評価方法としては、以下の方法を具体的に例示することができる。正常マウスに前記特定の癌細胞を皮下注射し、一定期間をおいて腫瘍を拡大させ、その後、(5)の導入方法により前記調製した発現抑制剤を1～数回投与する。投与後、発現抑制剤を導入したマウスと、導入していないマウスとの癌の大きさや生存率を比較評価することにより、発現抑制物質による発現抑制の評価を行うことができる。

以下、本発明の実施例について詳細に述べる。

【0050】

<実施例1>

本実施例では、PDGF受容体 α 遺伝子において、転写因子E2F-1により制御されている新規エキソンを同定した。

【0051】

まず、本願発明者は、マウスNIH3T3細胞がPDGFの添加によって、足場に非依存的に増殖することを見いだした。そこで、これらの細胞株において、PDGF受容体 α (PDGFR- α)の発現を調べたところ、PDGF受容体 α の発現は上昇し、これが転写レベルでの制御であることが明らかになった。

【0052】

サイクリンD1は、細胞周期依存的にpRbのリン酸化を介して転写因子E2F-1を活性化するため、この上昇が、E2F-1によるヒトPDGF受容体 α のプロモーターの調節のためであるかどうか調べた。転写開始点の-1395から+312までの配列 (Genomics, Vol.30, 224-232, 1995に報告されている転写開始点をもとに塩基の番号付けをした。GenBankアクセッション番号D50001S01参照) からなるプロモーター領域を、pGL3ルシフェラーゼベクターを用いてルシフェラーゼ遺伝子上流にクローニングし、サイクリンD1を過剰発現させたNIH3T3細胞に、E2F-1の発現ベクターと共にトランスフェクションによって導入した。24-72時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイを行い、上記プロモーターによる転写活性を調べた。ポジティブ・コントロールとしては、mFGFR-1のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を

挿入したプラスミドを用いた。その結果、mFGFR-1 プロモーターの転写活性は上昇するものの、PDGF 受容体 α のプロモーターの転写活性は上昇しなかった (図 4)。従って、従来知られていた PDGF 受容体 α のプロモーターは、サイクリン D1 を過剰発現させたマウス NIH3T3 細胞における PDGF 受容体 α の発現の上昇に関与していないことがわかった。

【0053】

そこで、転写因子結合配列検索 (TF search) により、ヒト PDGFR- α 遺伝子のエキソン 1 下流に E2F-1 と結合するコンセンサス配列があるか否かを調べたところ、E2F-1 が結合すると考えられる配列が、報告された転写開始点の下流約 1 kbp 付近に 4ヶ所かたまって存在することがわかった。そこで -295 から +1445 までの塩基配列からなる DNA を、ルシフェラーゼ遺伝子上流に結合し、得られたレポーターコンストラクトを用いて前記記載の方法と同様にルシフェラーゼアッセイを行い、E2F-1 による転写活性を調べた。その結果、この領域の転写活性は E2F-1 によって上昇することが確認できた (図 5)。さらに、E2F-1 の転写活性化能を欠失させた変異 E2F-1 (1 から 368 までのアミノ酸配列)、あるいは 132 番目のロイシンをグルタミン酸に置換して DNA 結合能を欠失させた変異 E2F-1 では、転写活性が見られないことから、この領域が実際に E2F-1 によって制御されていることが示唆された。

【0054】

しかし、推定される E2F-1 結合サイトは報告されている転写開始点の約 1.2 kbp 下流に存在し、このプロモーター活性が従来報告されていた転写開始点に作用するとは考えにくい。そこで、この領域が従来報告されている転写開始点に働いているかどうかを調べるために、この転写開始点を欠失した様々な長さの deletion mutant を作製して、上記の方法と同様にルシフェラーゼアッセイを行い、E2F-1 による転写活性を調べた。その結果、転写開始点の下流約 1 kbp まで欠失させたコンストラクトでもプロモーター活性を有し、さらに E2F-1 による転写活性の上昇も見られた。これらのことから、PDGFR- α の E2F-1 で制御される mRNA は、新たな転写開始点から発現する可能性が示唆

された(図6)。

【0055】

そこで、E2F-1による転写開始点の決定を5'-RACE法により行った。-295から+1445までの塩基配列からなるDNAを、ルシフェラーゼ遺伝子上流に結合したレポーターコンストラクトをトランスフェクションによって導入したNIH3T3細胞株からmRNAを抽出し、5'-Full RACE Core Set (TaKaRaの商品名)を用い、ルシフェラーゼ遺伝子配列に特異的なプライマー[フォワードプライマー1(配列番号3:5'-CCTTAATTAAGGGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTA-3')と、リバープライマー1(配列番号4:5'-CCTTAATTAAGGGGCGCAACTGCAACTCCGATAAAT-3')]を用いてPCRを行なったところ、増幅産物が得られた。そこで、この増幅産物のDNA配列を調べた結果、従来イントロンだと思われていた領域に、新規エキソンの存在が見出された。このようにして、従来イントロンと思われていた領域に、E2F-1によって転写制御される新規エキソンが存在することが明らかになった。

【0056】

<実施例2>

本実施例では、PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β が癌細胞において特異的に発現しているかどうかを確認した。

【0057】

PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β と既知のエキソン4の配列からプライマー[フォワードプライマー2(配列番号5:5'-CCTTAATTAAGGAACCGCACACCAAGGGGCCCTCATT-3')と、リバープライマー2(配列番号6:5'-AACAGCACAGGTGACCACAATCG-3')]を設計し、図1に示される各癌細胞から抽出した全RNAを用いてRT-PCR法を行った。図1に示されるように、ヒト大腸癌細胞SW480とヒト食道癌細胞TTnにおいてシグナルが検出された。そこで、これらの増幅バンドを回収し、DNA配列を調べた結果、これらのバンドがPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β と既知のエキソン2~4の配列が連結したヒトPDGFR- α のmRNA断片であることがわかり、同時に配列番号1に示される全長338bpのエキソン1 β の配列を決定した。すなわち、新たに見出されたプ

ロモーター領域はヒトPDGFRのmRNA 2のものであることがわかった(図7)。

【0058】

【発明の効果】

以上のように、本発明によると、癌特異的なPDGFシグナルだけを選択的に抑制できる発現抑制方法に用いられるためのポリヌクレオチド、発現抑制物質、発現抑制剤、及び癌の治療剤を提供することができる。

【0059】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY

<120> PDGF receptor gene exon1 beta and its use

<130> C0020699

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Inventor: Imoto, Masaya

Inventor: Minato, Yusuke

Inventor: Tashiro, Etsu

<400> 1

gcgcgggggc gacagcggcg gcgcgggcgg gcggtctgga ataatgaaa acacatttgg 60

ccctgagtga agaagtcgtc gtcgcctcgc attccagcaa ctgggatttg aggaatttcg 120

aaccgcacac caagggggccc tcattgtgct ccgtggcccc cgccccgcc cgtcttcccg 180

cgccccctcc tcggtggaat catttctgca ttgcccgggg gctctgcttt cgctcagttc 240

tgccgcagg caggaagaga ggaaaggtct ccaggaaggt gccgaacttc ttgtgaggaa 300

gttagggacg acttggaact ggggaaactt gtttcag 338

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Promoter sequence

<400> 2

taatacgact cactata

17

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer 1

<400> 3

ccttaattaa gggattctcg catgccagag atccta

36

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer 1

<400> 4

ccttaattaa ggggcgcaac tgcaactccg ataaat

36

<210> 5

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer 2

<400> 5

ccttaattaa ggaaccgcac accaaggggc cctcatt

37

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer 2

<400> 6

aacagcacag gtgaccacaa tcg

23

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施例 2 において、R T - P C R を用いて調べた P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β ~ 4 の発現パターンを示す図である。

【図 2】

リボザイムにおける構造を示す図である。

【図 3】

マキシザイムにおける構造を示す図である。

【図 4】

本発明の実施例 1 において、-1395 から +312 までの塩基配列を含むレポーターコンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイの結果を示す図である。なお、図中の「+」は-1395 から +312 までの塩基配列を含むレポーターコンストラクトを 100 ng 導入した結果を示し、「-」は、-1395 から +312 までの塩基配列を含まないレポーターコンストラクトを 100 ng 導入した結果を示す。

【図 5】

本発明の実施例 1 において、-517 から +1445 までの塩基配列を含むレポーターコンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイの結果を示す図である。

【図 6】

本発明の実施例 1 において、転写開始点を欠失した様々な長さの deletion mutant を用いたルシフェラーゼアッセイの結果を示す図である。

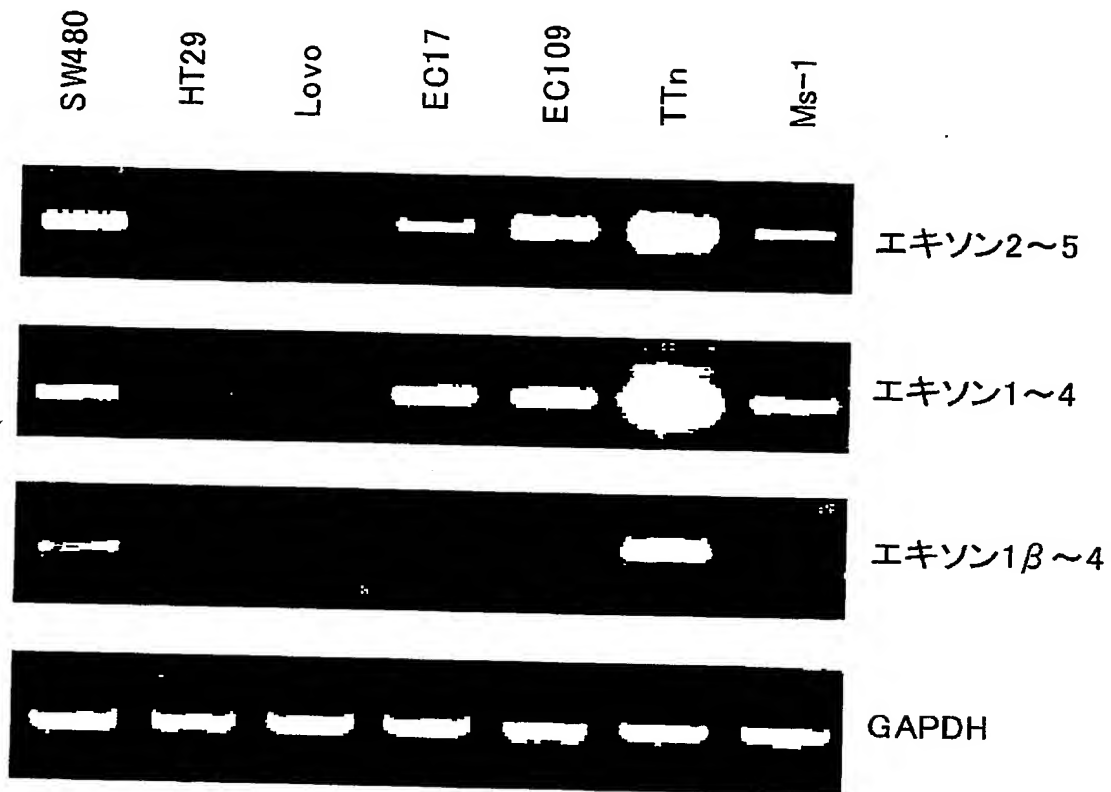
【図 7】

基本転写因子により転写される PDGFR α の mRNA と、E2F-1 により転写される PDGFR α の mRNA の概略を示す図である。

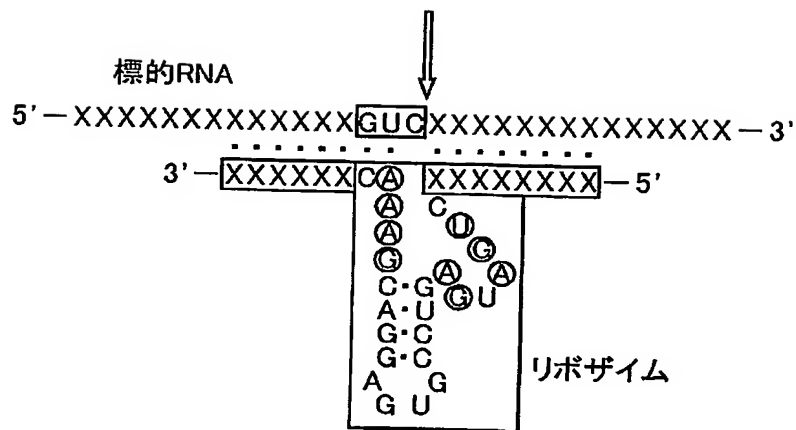
【書類名】

図面

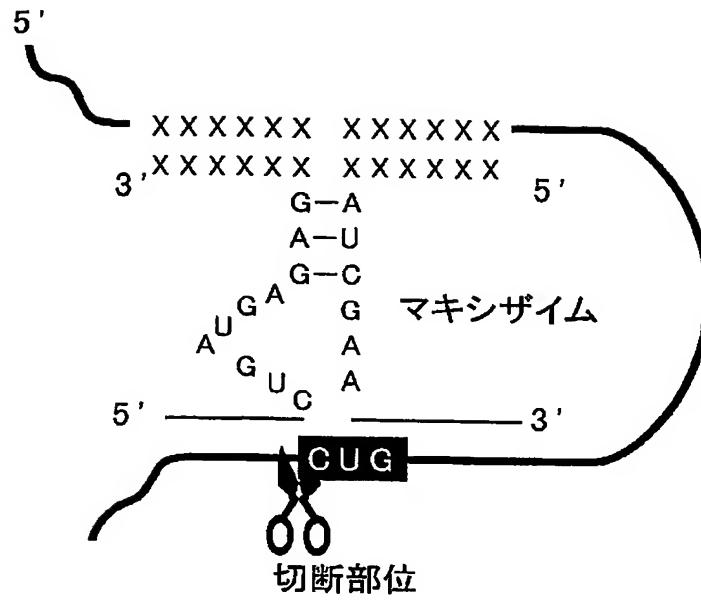
【図 1】



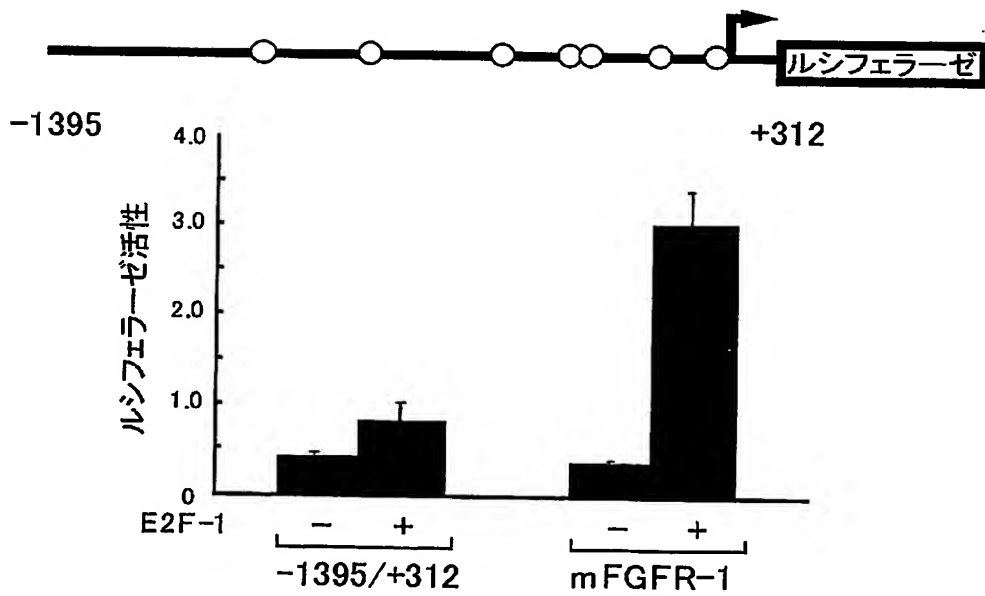
【図 2】



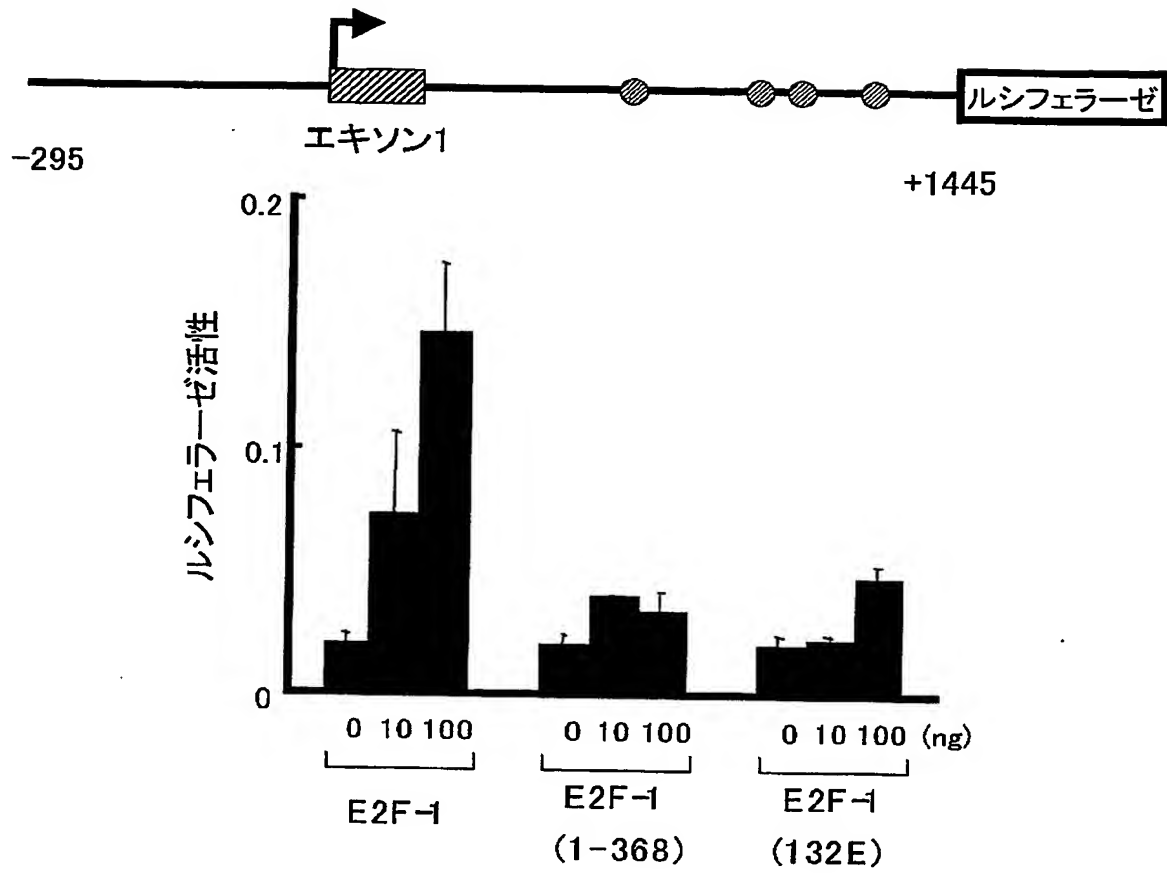
【図 3】



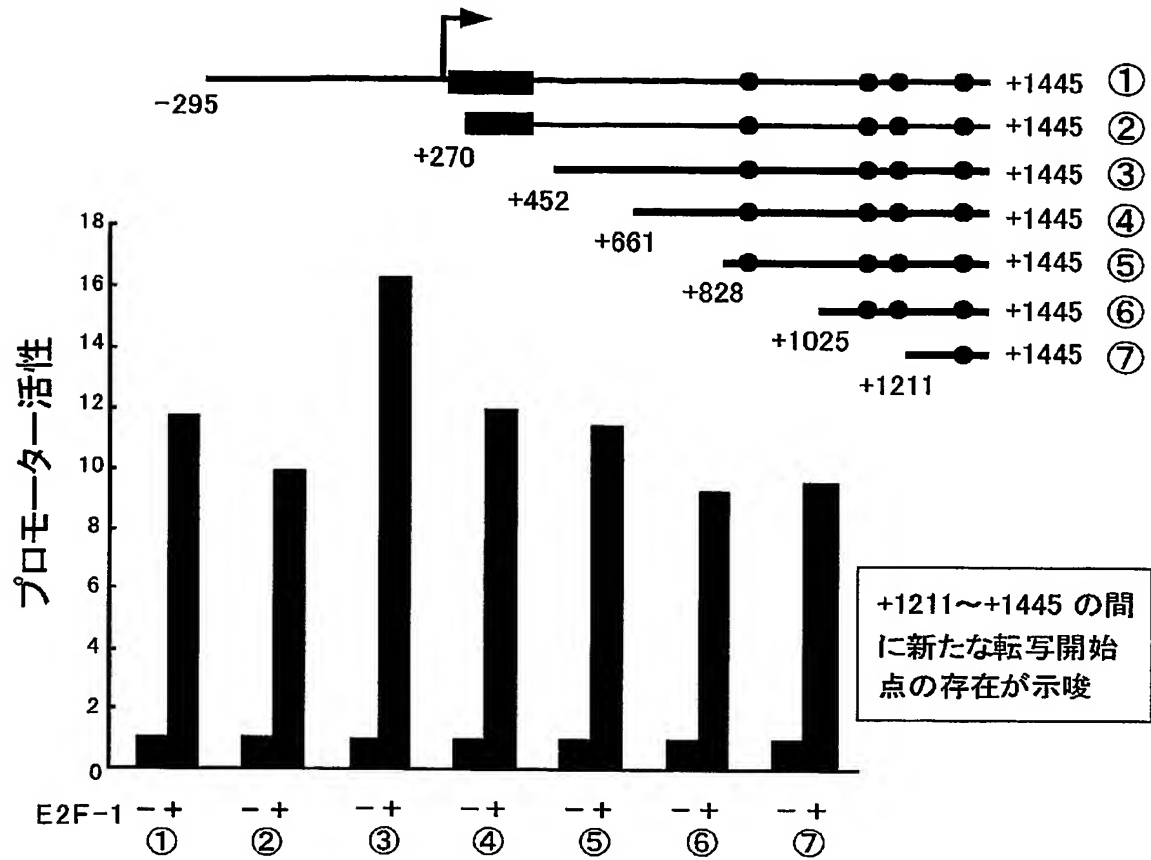
【図 4】



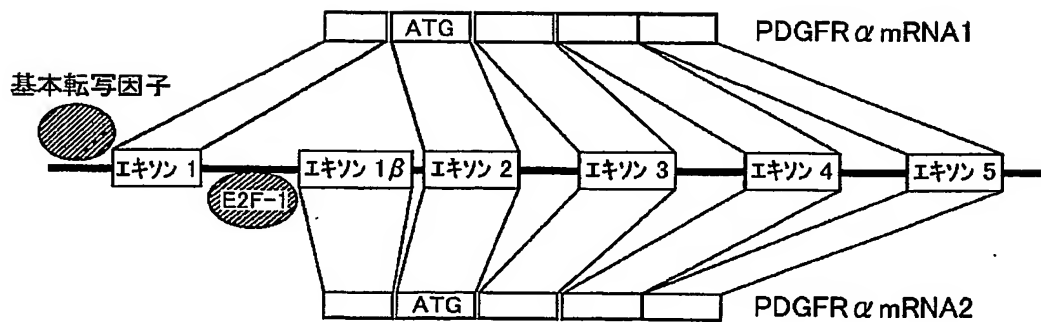
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】

要約書

【要約】

【課題】 癌特異的なPDGFシグナルだけを選択的に抑制できる発現抑制方法に用いられるためのポリヌクレオチド、発現抑制物質、発現抑制剤、及び癌の治療剤を提供する。

【解決手段】 特定の癌細胞において発現するPDGF受容体 α 遺伝子のエクソン1 β の塩基配列、又はその一部のポリペプチドを基に作製したアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又はRNAiを用いて、PDGF受容体 α 遺伝子のエクソン1 β から転写されるmRNAの翻訳を抑制する。また、アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又はRNAiなどの発現抑制物質を有効成分とする発現抑制剤は、癌の治療剤として有効である。

特願2002-332142

出願人履歴情報

識別番号

[899000079]

1. 変更年月日

1999年 9月17日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区三田2丁目15番45号

氏 名

学校法人慶應義塾